

Formulár ZK - Záverečná karta projektu

Riešiteľ: RNDr. Robert Farkaš, CSc.	Evidenčné číslo projektu: APVT-51-027402
Názov projektu: Gény regulujúce programovú bunkovú smrť.	
Na ktorých pracoviskách bol projekt riešený:	Ústav expeperimentálnej endokrinológie SAV, Bratislava
	Katedra genetiky, Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava
Ktoré zahraničné pracoviská spolupracovali pri riešení (názov, štát):	
Udelené patenty alebo podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory vychádzajúce z výsledkov projektu:	
Publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu (uved'te i publikácie prijaté do tlače alebo pripravované): <i>Uvádzajte maximálne päť najvýznamnejších publikácií.</i>	Akdemir F., <u>Farkaš R.</u> , Chen P., Juhász G., <u>Medveďová L.</u> , a kol. (2006) Autophagy occurs upstream or parallel to the apoptosome during histolytic cell death. <i>Development</i> 133 (8): 1457-1465. (IF = 9,162).
	Wilson T.G., Wang S., <u>Beňo M.</u> and <u>Farkaš R.</u> (2006) Wide mutational spectrum of a gene involved in Hormone action and insecticide resistance in <i>Drosophila melanogaster</i> . <i>Mol. Genet. Genomics</i> 276 (3): 294-303. (IF = 2,632).
	Kováčiková M., Raška I., Mateášik A., Chase B.A. and <u>Farkaš R.</u> (2006) Binding of Doa kinase to specific loci in polytene chromosomes of <i>Drosophila melanogaster</i> . <i>Endocr. Regul.</i> 40 (1): 21-27.
	<u>Medveďová-Mentelová L.</u> , Low P., Juhász G., Sass M. and <u>Farkaš R.</u> : Autophagy and apoptosis are parallel and independent processes in <i>Drosophila</i> steroid hormone-triggered cell death. <i>J. Cell Biol.</i> (under revision).
	<u>Medveďová-Mentelová L.</u> , Low P., Juhász G., Sass M. and <u>Farkaš R.</u> : Developmentally-regulated cell death of <i>Drosophila</i> salivary glands utilizes ER stress-linked apoptosis. <i>J. Cell Science</i> (under revision).
V čom vidíte uplatnenie výsledkov tohto projektu:	Identifikáciou nových génov zúčastnených na signálnej dráhe ER-stresom spúšťanej apoptózy u <i>Drosophila</i> je možné identifikovať nové diagnostické markery alebo terapeutické ciele pôsobenia farmaceutík pre vážne degeneratívne ochorenia, ktorých sprievodným znakom je vytváranie ER inklúzií.

Podpisom záverečnej karty riešiteľ vyjadruje svoj súhlas ku zverejneniu údajov v nej uvedených.

Podpis riešiteľa:

Dátum:30..1..2007.....

Charakteristika výsledkov

Evidenčné číslo: APVT-51-027402

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - slovensky:

Kombináciou molekulárnych, genetických, mikroskopických a ďalších metód sme analyzovali priebeh hormonálne kontrolovanej programovej bunkovej smrti (PCD) v larválnych slinných žľazách počas metamorfózy u *Drosophila*. V prvej fáze našej výskumnej práce sme použitím viacerých mutácií pre gény *Autophagy (Atg)*, *Tor* a priamych aktivátorov kaspáz z rodiny "death domain" génov (*rpr*, *grim*, *hid* a *skl*) resp. ich transgénov s následnou analýzou fenotypu preukázali, že proces PCD nesie všetky znaky typické pre apoptózu a to i napriek tomu, že sa jedná o neobyčajne synchronizovanú dizintegráciu celého orgánu a nielen elimináciu jednotlivých buniek. Identifikovali sme rad génov (*P58^{IPK}*, *Hsc70.3*, *Ca-P60A*, *Crc*, *Cnx99A*, *Cct5* a *Hop*) zodpovedných za bezprostrednú a priamu aktiváciu exekučnej fázy apoptózy, ktorá prebieha postupným rozpadom endoplasmatického retikula (ER) procesom vezikularizácie jeho lamiel. Tento fenotyp je identický s fenotypom pozorovaným počas normálneho vývoja v skorých kukulových štádiách resp. ako následok ektoptickej expzie "death domain" génov alebo proximálnych kaspáz (*Dronc* a *Dredd*). V rýchlo sa formujúcich vezikulách retikulárneho pôvodu sme našli výrazne zvýšenú prítomnosť myelinových štruktúr charakteristických pre akumuláciu nekorektné foldovaných proteínov, svedčiac o nefunkčnosti ER-rezidentných chaperónov. Výsledky experimentov dokázali, že bunková smrť slinných žľaz *Drosophila* je výsledkom akumulácie tzv. ER stresu, vznikajúceho pôsobením fenoménu známeho pod názvom unfolded protein response (UPR). UPR je všeobecne rozšírená forma ochrany eukaryotických buniek pred poruchami vo foldingu proteínov, ktoré môžu vznikáť pri vysokých nárokoch na proteosyntézu počas diferenciacných a proliferacných procesov. Na druhej strane nekontrolovaná alebo narušená signalizácia UPR je príčinou celého radu vážnych najmä degeneratívnych ochorení ako sú Parkinsonova, Huntingtonova, Alzheimerova či Lou-Gehrigova choroba alebo amyotropná laterálna skleróza, u ktorých spoločným menovateľom je tvorba tzv. inklúzií, najčastejšie v lúmene ER ako následok akumulácie nekorektné foldovaných proteínov. V prípade slinných žľaz *Drosophila* sa jedná o programovú aktiváciu ultimátneho UPR mechanizmu, bezprostredne vedúceho k apoptóze. Pre sekretorické typy buniek a zvlášť u slinných žľaz *Drosophila* je preto prítomnosť rozsiahlych plôch ER úplne charakteristická. Takto unikátna apoptóza celého orgánu, ktorá si i v tomto prípade zachováva bunkovú autonómiu, si vyžaduje nesmiernu synchronizáciu a efektívnosť. Z tohto pohľadu sa potom javí logické, že slinné žľazy využijú na aktiváciu apoptózy najrozsiahlejšiu a do všetkých kompartmentov bunky zasahujúcu organelu t.j. endoplasmatické retikulum. Okrem toho účasť tumor supresorových génov na implementácii apoptózy slinných žľaz, doprevádzaná výskytom enormne veľkých a invazívnych nádorov mozgu a imaginálnych diskov posúva predmetný výskum do oblasti súvisiacej s potenciálnym praktickým využitím získaných poznatkov v diagnostike prípadne terapii. Jednou z hlavných úloh farmaceutických skriningov je vyhľadávanie potenciálnych cieľov pôsobenia známych ale najmä novo syntetizovaných organických látok. Identifikácia doposiaľ neznámych členov signálnych dráh kontrolujúcich nádorovú transformáciu, hormonálnu odozvu a apoptózu súčasne môže viesť k odhaleniu nových terapeutických cieľov ďaleko efektívnejšie na dobre definovanom a rozpracovanom modeli u *Drosophila* s následnou extrapoláciou na ortológov u cicavcov vrátane človeka.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu (max. 20 riadkov) - anglicky:

By combining molecular, genetic, microscopical and other methods we have analysed hormone-triggered programmed cell death (PCD) of larval salivary glands during metamorphosis of *Drosophila*. During the early period of the work by using mutations for genes of *Autophagy (Atg)*, *Tor* and direct activators of caspases from the family of "death domain" proteins (*rpr*, *grim*, *hid* and *skl*) or their transgenes followed by phenotypic analysis we have shown that process of PCD displays all crucial features of apoptosis, even though that in this case the entire organ is synchronously disintegrated in contrast to apoptosis-typical elimination of single cells. We have identified a series of genes (*P58^{IPK}*, *Hsc70.3*, *Ca-P60A*, *Crc*, *Cnx99A*, *Cct5* and *Hop*) responsible for immediate activation of execution phase of the apoptosis which under described circumstances takes place by disintegrating endoplasmic reticulum (ER) into vesiculated lamellae. This is identical to phenotype observed in early pupal stages of normal development and it is also a consequence of ectopic expression of "death domain" proteins as well as of proximal caspases (*Dronc* a *Dredd*). Within rapidly forming ER vesicles we have found increased abundance of myelin-like structures that are typical for accumulation of incorrectly folded proteins indicating lowered function of ER chaperones. This suggests that *Drosophila* salivary gland PCD reflects accumulated ER stress as a result of the unfolded protein response (UPR). The UPR is widely used way of cell self-protection in eukaryotes against misfunctional protein folding that can be raised at increased demands on protein synthesis during cell differentiation and proliferation. On the other hand, inappropriate UPR signalling is often associated with several degenerative diseases including Parkinson's, Huntington's, Alzheimer, Lou-Gehrig disease or amyotrophic lateral sclerosis (ALS) the common feature of which is formation of inclusions inside of ER lumen. For secretory type of cells as *Drosophila* salivary glands are characteristic presence of widespread areas of ER. This unique whole-organ apoptosis which remains still cell autonomous requires highly efficient and synchronous action. This may be a reason why *Drosophila* salivary glands use ER to ensue PCD execution, as ER is most abundant organelle found in all cell compartments. Participation of tumor suppressor genes in implementation of PCD program, along with malignant tumor formation in brains and imaginal discs provides clues for potential use of the research results in diagnosis and therapy. It is one of the key demands in pharmaceutical screening strategy to search for new potential drug targets. Identification of novel components of signalling pathways that take part in the control of cell transformation, hormonal response and apoptosis can provide new therapeutic or diagnostic vistas at much higher efficiency if we use well-defined model system such as *Drosophila* with excellent extrapolation for their orthologues in mammals including humans.

Podpis riešiteľa: